

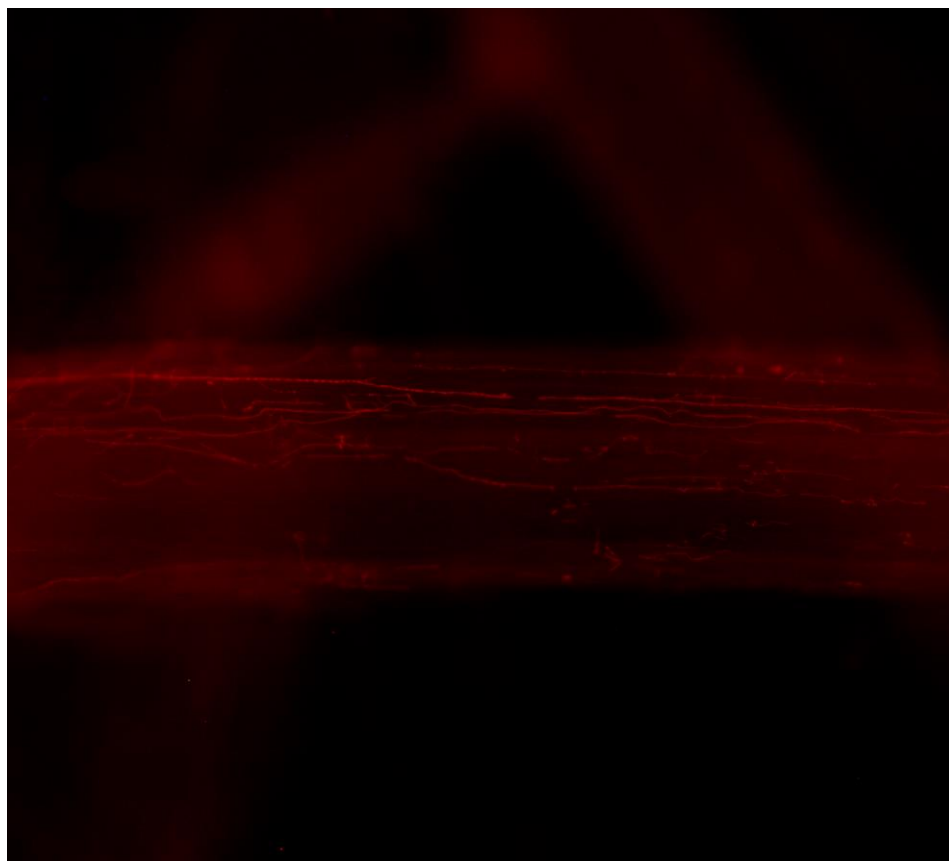
Aproximación mediante microscopía de fluorescencia al comportamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* en el ambiente radicular de algunas cucurbitáceas de interés agronómico.

Trabajo de Fin de Máster

Autor: Alejandro Ragel López

Tutor de Empresa: Miguel de Cara García

Tutor Académico: María José López López



Facultad de Ciencias.
Centro de Investigación IFAPA-La Mojonera.
Máster de Biotecnología Industrial y Agroalimentaria.
Curso 2017/2018.



Departamento de Micología. Centro de Investigación IFAPA-La Mojonera

FACULTAD DE CIENCIAS. UNIVERSIDAD DE ALMERIA.

D. Miguel de Cara García y Dña. María José López López autorizan que:

El presente trabajo “Comportamiento de *Forc* frente a estímulos radiculares de algunas cucurbitáceas de interés agronómico. Aproximación mediante microscopía de fluorescencia”, presentado por el alumno **ALEJANDRO RAGEL LÓPEZ** para optar al título de Trabajo de Fin de Máster de Biotecnología Industrial y Agroalimentaria de la Universidad de Almería, ha sido realizado bajo su dirección y una vez revisado, no encuentran objeciones para que sea presentado a su lectura y defensa.

En Almería a 2 de Julio de 2018

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo y a la enorme aportación de Miguel, que me ha enseñado un campo que para mí era poco conocido y lo interesante que éste puede llegar a ser, por ayudarme a crecer como científico y a ver los problemas como oportunidades. También agradecer a Julio sus enseñanzas y su afán de comunicarme sus conocimientos. A Marta por ser paciente conmigo y ayudarme en gran medida en la realización de este trabajo. A Alejandro por explicarme con gran entusiasmo y detalle las investigaciones que se llevan a cabo, siempre con un buen desayuno de por medio. A mi madre y a mis abuelos, que aunque no comprenden mucho lo que les cuento, me apoyan enormemente. Quiero dar las gracias en especial a Rocío, que me entiende mejor que nadie y sabe cómo darme ese empujón que a menudo me hace falta. Y gracias a María José por preocuparse por mí y facilitarme la elaboración de este trabajo de Fin de Máster.

Índice

Resumen	6
Abstract	7
1. Introducción	8
1.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	8
1.2 Microscopía de fluorescencia	11
2. Hipótesis y Objetivos	12
2.1 Hipótesis	12
2.2 Objetivos	12
3. Materiales y Métodos	13
3.1 Origen de la cepa transformada de <i>Forc</i>	13
3.2 Comprobación de la capacidad de colonización de <i>Forc</i> T3i1 de las raíces en medio de cultivo agarizado	14
3.3 Estudio de colonización radicular en plantas sembradas en vermiculita estéril	15
3.4 Estudio del comportamiento del hongo con exudados radiculares	19
3.5 Análisis de datos	21
3.6 Equipo de microscopia de fluorescencia	21
4. Resultados	22
4.1 Comprobación de la capacidad de colonización de <i>Forc</i> T3i1 de las raíces en medio de cultivo agarizado	22
4.2 Estudio de colonización radicular en plantas sembradas en vermiculita estéril	23
4.3 Estudio de comportamiento del hongo con exudados radiculares	29
5. Discusión	31
5.1 Comprobación de la capacidad de colonización de <i>Forc</i> T3i1 de las raíces en medio de cultivo agarizado	31
5.2 Estudio de colonización radicular en plantas sembradas con vermiculita estéril	31
5.3 Estudio de comportamiento del hongo con exudados radiculares	32
6. Conclusiones	34
7. Propuestas de futuro	35
8. Bibliografía	36

Resumen

La fusariosis radicular producida por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (*Forc*) es una enfermedad que afecta específicamente a algunos cultivos de cucurbitáceas. En este trabajo se estudió el comportamiento del patógeno frente a una especie susceptible como el pepino, y a otra resistente como la calabaza (variedades usadas como portainjertos de sandía y, en menor medida, de melón y pepino). El objetivo principal de este estudio fue monitorizar la interacción raíz-hongo en distintas variedades de plantas. Para tal fin, se empleó una cepa de *Forc* transformada genéticamente capaz de expresar la proteína *DsRed2* que emite fluorescencia roja, permitiendo la observación *in vivo* de raíces infectadas con el hongo mediante microscopía de fluorescencia. Se realizaron lecturas durante dos semanas tras la inoculación de las plantas, en dicho período el hongo mostró una alta capacidad de colonización radicular, observándose fenómenos como adherencia, penetración intercelular e intracelular.

Adicionalmente, se llevaron a cabo estudios de germinación y crecimiento de conidias de *Forc* en ausencia de plantas, únicamente utilizando los exudados radiculares, para estudiar una parte de la fase saprofítica del hongo. Los resultados obtenidos mostraron que el hongo era capaz de crecer hasta formar hifas desarrolladas y ramificadas, incluso en ausencia de exudados, solamente con agua estéril. Se confirmó la viabilidad de las conidias al comprobar la emisión de fluorescencia roja, para lo que es indispensable que el hongo esté vivo.

En conjunto, estos resultados permiten aportar nuevos conocimientos sobre el comportamiento de *Forc* que pueden usarse para prevenir los problemas que ocasiona en los cultivos acarreado importantes pérdidas económicas.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*, proteína *DsRed2*, pepino, calabaza, exudados radiculares.

Abstract

Crown and root rot of cucumber caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (*Forc*) is a disease that specifically affects some cucurbitaceous crops. In this work, the behavior of the pathogen was studied against a susceptible host such as cucumber, and a resistant one like pumpkin (varieties used as rootstocks of watermelon and to a lesser extent of melon and cucumber). The main objective of this study was to monitor root-fungus interaction for different plant varieties. For this purpose, a genetically transformed strain of *Forc* capable of expressing the *DsRed2* protein that emits red fluorescence was used, allowing *in vivo* observation of the roots infected with the fungus by fluorescence microscopy. Records were carried out for two weeks following the inoculation of the plants, in that period the fungus showed high root colonization, thus observing phenomena such as adhesion, intercellular and intracellular penetration.

Additionally, studies of germination and growth of conidia of *Forc* were carried out in the absence of plants, only using the root exudates to study a part of the saprophytic phase of the spores. The results showed that the fungus was able to form developed and branched hyphae, even in the absence of exudates, only with sterile water. The viability of the conidia was confirmed by checking red fluorescence emission, for which it is essential that the fungus is alive.

Together, these results allow us to provide new information to better understand the behaviour of *Forc*, thus helping to remedy the problems it causes in crops, leading to significant economic losses.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, *DsRed2* protein, cucumber, pumpkin, root exudates.

1. Introducción

1.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

Almería es una de las provincias que más hectáreas dedica a la producción de pepino (*Cucumis sativus*) en España dentro de invernaderos (5000 ha aproximadamente) y cuya producción alcanzó durante los años 2012-2013 las 411189 toneladas. Esto supone el 64,9% de la superficie y el 62,9% de la producción total en Andalucía. En la campaña 2011-2012 se estimó que las ventas alcanzaron un valor de 169 millones de euros (Valera *et al.*, 2014).

En el año 2000 se citó en Almería la presencia de un hongo fitopatógeno, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (*Forc*) en plantas enfermas de pepino (Vargas *et al.*, 2009). *Forc* se describió por primera vez en 1996 por Vakalounakis, que observaba grandes pérdidas en la producción de pepino cultivados en los invernaderos de Grecia (Williams, 1996). Desde esa fecha, se ha citado la presencia del patógeno en otros países como Canadá (Punja *et al.*, 1998), Australia (Alcázar *et al.*, 2006) y China (Vakalounakis *et al.*, 2004).

En Almería, en el año 2011, la podredumbre de cuello y raíz de la planta de pepino afectó al 4,7% (un 20% en 2010) de las plantas llegando a alcanzar un 25% en la Mojonera. Y en la costa de Granada el mismo año, la fusariosis de las raíces se manifestó al final de los cultivos llegando a afectar hasta un 10% en el mes de Junio de 2011 (R.A.I.F. *et al.*, 2012).

Fusarium oxysporum es una especie fúngica que afecta principalmente de forma vascular a las plantas (Messiaen, 1995). *Forc* es una forma especializada de dicho hongo que de forma inicial infecta a las raíces de las cucurbitáceas, una vez que el hongo se ha establecido en la raíz se propaga por el tallo como el resto de *Fusarium* vasculares. *Forc* es capaz de parasitar varias especies vegetales como el pepino, melón (*Cucumis melo*) y sandía (*Cucumis lanatus*) (Williams, 1996).

Los principales síntomas de *Forc* en pepino son la podredumbre del cuello y de las raíces tanto primarias como secundarias de la planta, amarilleamiento y decoloración vascular (Cerkauskas *et al.*, 2001), teniendo como consecuencia final que la planta muera de forma prematura (Elkabetz *et al.*, 2016). Estos síntomas suelen tener aparición a bajas temperaturas (17°C) y son muy visibles cuando la planta ha empezado a formar sus primeros frutos. El tallo puede presentar decoloración amarillenta acompañado de una necrosis xilemática que se extiende por el mismo. Los estados más avanzados de esta enfermedad muestran una desintegración casi total de los tejidos del tallo mediante la aparición de grietas necróticas que pueden llegar a medir 15 cm, mientras que las raíces presentan podredumbre marrones. Además de abundante micelio de color blanco que se instala sobre el hipocotilo (Alcázar *et al.*, 2006) y que en ambientes húmedos se cubre de esporodocios de *Fusarium* de color salmón (**Figura 1**) (Vargas *et al.*, 2009).

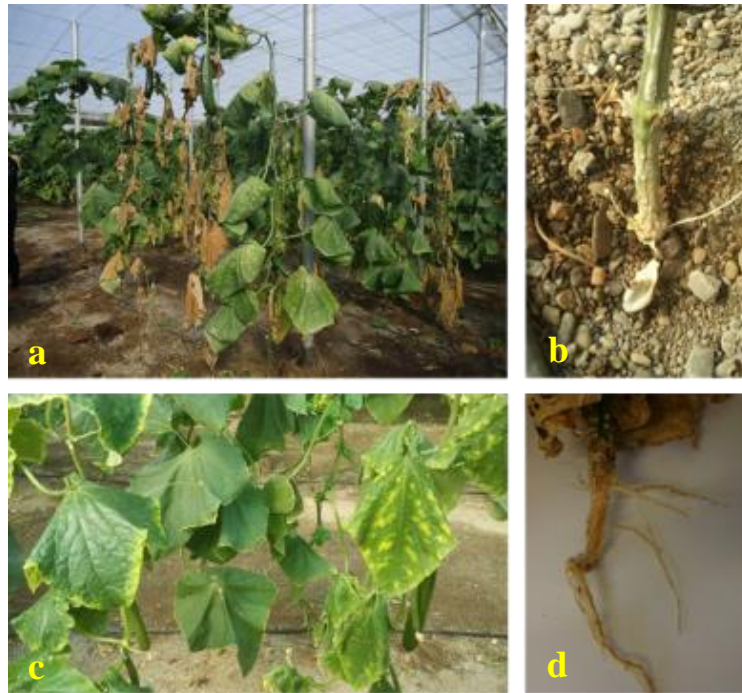


Figura 1: Plantas de pepino inoculadas con el hongo *Forc* en los invernaderos del Centro de Investigación IFAPA-La Mojonera. Las plantas muestran los síntomas típicos producidos por el hongo: las hojas muestran amarilleamiento y marchitez (a y c); mientras que el tallo se decolora acompañado de una necrosis xilemática (b); y las raíces presentan podredumbre marrón (d).

Fusarium oxysporum es un hongo que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los mecanismos que tiene el hongo para evadir las defensas de los organismos vegetales (Bosland, 1988). Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento. La morfología de éstas es muy variable y en cultivo *in vitro* con medio PDA suele producir abundante micelio de color blanco rosáceo.

El hongo produce tres tipos de esporas:

- Microconidias: Esporas naviformes generalmente unicelulares, sin septos o monotabicadas, hialinas; se forman sobre fiálidas laterales o sobre conidióforos poco ramificados. Suelen tener una longitud entre 5-12 μm (Nelson *et al.*, 1960) (**Figura 2a**).
- Macroconidias: Esporas de paredes delgadas, fusiformes, largas y ligeramente curvadas, con varias células, compuestas entre 3 y 5 septos, y células del pie y apical notablemente marcadas. Tienen un tamaño de 27 a 46 μm de largo (Nelson *et al.*, 1960) (**Figura 2b**).
- Clamidosporas: Esporas esféricas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y conidias, con paredes gruesas. Su tamaño varía entre las 5 y 15 μm (Nelson *et al.*, 1960). El hongo utiliza esta forma de espora para poder sobrevivir a las condiciones desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre cuando hay ausencia de hospedantes (Garrett, 1970) (**Figura 2c**).

1. Introducción

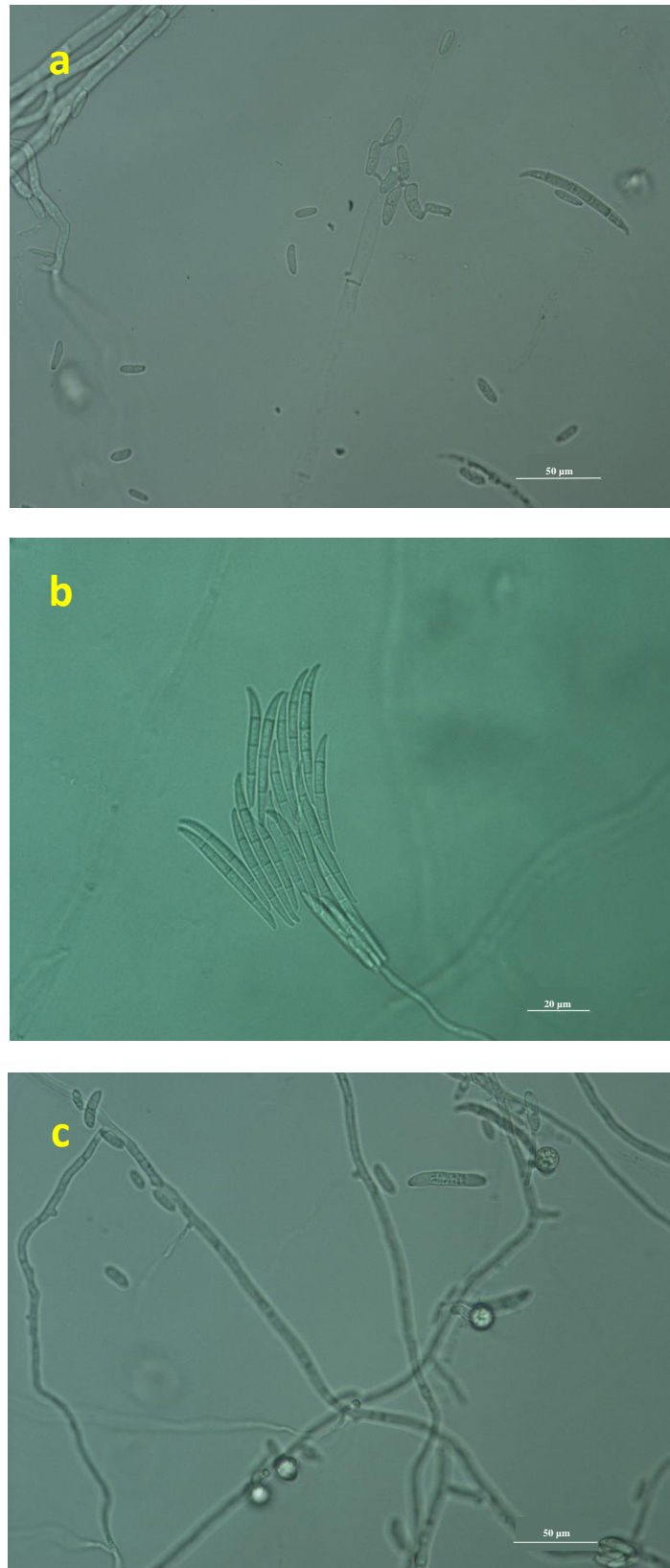


Figura 2: Fotografías tomadas con el microscopio óptico de una placa con el hongo *Forc*, en las que se pueden ver los distintos tipos de esporas que produce el patógeno: (a) imagen obtenida con aumento de 10x de las microconidias del hongo; (b) imagen a 20x de las macroconidias del hongo con forma alargada y ligeramente curvada; y (c) esporas de resistencia en forma de clamidosporas a un aumento de 10x.

F. oxysporum es un hongo que puede sobrevivir en forma de clamidospora, sobre los restos vegetales y en el suelo durante años. Sin embargo, para tiempos cortos, lo hace en forma de microconidia que será la responsable de producir las hifas mediante reproducción asexual, siendo la forma sexual aún desconocida. Por tanto, la forma más utilizada por el patógeno para propagarse son las microconidias, ya que las clamidosporas aparecen cuando los síntomas de la enfermedad en la planta son avanzados.

Las microconidias suelen aprovechar las corrientes de agua de riego para propagarse por el suelo y ponerse en contacto con las raíces, se adhieren a ellas y el hongo comienza a generar tubos germinativos que colonizan el tejido radical. Estos tubos, son los encargados de originar las hifas permitiendo que la infección se extienda. La entrada del hongo en su anfitrión puede verse favorecida por la presencia de heridas superficiales en la epidermis en la planta, y una vez en el interior, la velocidad de propagación depende principalmente de la temperatura.

1.2 Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia se basa en el empleo de marcadores fluorescentes con el fin de monitorizar, en este caso, las interacciones entre el patógeno *Fusarium oxysporum* y las distintas plantas dentro de los tejidos bajo condiciones fisiológicas determinadas. En este trabajo el marcador utilizado es la proteína *DsRed2*, un homólogo de la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) (Wall *et al.*, 2000) que se produce de forma natural en las regiones coloreadas del falso coral *Discosoma* sp. y que emite fluorescencia de color rojo. Esta biomolécula se ha utilizado para estudios de colonización de la planta huésped con hongos patógenos pertenecientes a varias formas especializadas de *F. oxysporum* causantes de las enfermedades anteriormente descritas (Nahalkova *et al.*, 2003). Siendo necesario realizar la transformación genética de un aislado del microorganismo para que exprese de forma natural la proteína *DsRed2*. Tal y como se hizo en trabajos previos (Muela Jordán L., 2015; Nahalkova *et al.*, 2003), las plantas se inocularon con el transformado del hongo, y se dejaron crecer para que entraran en contacto con las raíces. En dichos estudios, para detectar la presencia de *Forc* y distinguir con claridad el crecimiento del micelio por los tejidos, utilizaron un microscopio de fluorescencia equipado con lámparas de mercurio y filtros de excitación y de barrera para la fluorescencia verde.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

Hipótesis I. El hongo patógeno *Forc* es capaz de colonizar las raíces de diferentes especies de cucurbitáceas que se muestran tanto resistentes como susceptibles en campo. Las plantas resistentes pueden confinar al hongo dentro de las células, de tal forma que detiene el crecimiento radicular y no se extiende la infección, mientras que las plantas susceptibles carecen de dicha capacidad.

Hipótesis II. *Forc* es capaz de formar tubos germinativos y crecer a expensas de los exudados que liberan las raíces de las plantas, sin necesidad de entrar en contacto con las mismas.

2.2 Objetivos

El objetivo principal es estudiar mediante microscopía de fluorescencia el comportamiento de colonización radicular de un aislado transformado genéticamente de *Forc* en plantas de calabaza y de pepino, siendo las primeras resistentes y las segundas susceptibles al microorganismo.

A su vez, se pueden considerar una serie de objetivos secundarios:

Objetivo I. Estudiar la capacidad de infección de *Forc* en calabaza y pepino.

Objetivo II. Estudiar el comportamiento del hongo dentro de las raíces a lo largo de dos semanas.

Objetivo III. Estudiar la capacidad de crecimiento del hongo en ausencia de plantas, utilizando solamente los exudados radiculares de las plantas y observar el grado de desarrollo que alcanza el hongo.

3. Materiales y Métodos

3.1 Origen de la cepa transformada de *Forc*

La cepa de *Forc* (código T3i1) utilizada en este trabajo procede de un aislado natural de un cultivo monospórico (monoconidial) codificado como “Forc 14/1 Fo3” depositado en la Micoteca del Departamento de Agronomía de la Universidad de Almería. Este hongo se aisló a partir de material vegetal con síntomas de marchitez que presentaba una planta de pepino enferma en estado adulto. La variedad de pepino era Estrada (Semillas Fitó, España) y fue cultivada en ciclo de otoño/invierno en la costa de Granada. El aislamiento, identificación y caracterización patogénica del aislado salvaje “Forc 14/1 Fo3” fueron llevados a cabo entre Enero y Abril de 2014 por el grupo de investigación “Producción vegetal en sistemas de cultivo mediterráneos” AGR200 de la Universidad de Almería.

El aislado monospórico fue transformado por el doctor Miguel de Cara (IFAPA-La Mojonera) en el laboratorio de Agroecología del INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) ubicado en Dijon (Francia) durante una estancia científica. Dicha transformación se llevó a cabo mediante un aislado de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo un vector binario con la región codificante de la proteína *DsRed2* ligada a un gen de resistencia a antibiótico (Higromicina B), y que fue usada en estudios anteriores con otras cepas de *Fusarium* (Nahalkova *et al.*, 2008).

De entre las colonias transformadas, se seleccionó aquella cepa que emitía fluorescencia roja y que se asemejaba al aislado original presentando patogenicidad sobre pepino cv Marketer (Ramiro Arnedo, España) y una buena aptitud saprofítica (crecimiento en medio de cultivo y producción de los distintos tipos de spora del hongo similar a la del aislado original). El aislado fluorescente se conservó en medio CDA (Czapek Dox Agar) (NaNO_3 [2g/L⁻¹], KH_2PO_4 [1g/L⁻¹], $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [0,5g/L⁻¹], KCl [0,5g/L⁻¹], $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [0,1g/L⁻¹], Sacarosa [30g/L⁻¹], Agar [12g/L⁻¹], Higromicina B [100g/L⁻¹]), se repicó bimensualmente a placas nuevas con el mismo medio de cultivo. Para este estudio se ha trabajado con el repicado vigésimo cuarto del transformado original. La primera generación del hongo transformado se conserva en el Centro de Investigación IFAPA-La Mojonera en un congelador a -80 °C en forma de propágulos en suspensión de glicerol al 15% en agua estéril.

3.2 Comprobación de la capacidad de colonización de *Forc* T3i1 de las raíces en medio de cultivo agarizado

Para llevar a cabo este estudio era necesario comprobar la capacidad infectiva y de emisión de fluorescencia del hongo transformado, ya que se ha mantenido en un congelador perteneciente al Centro de Investigación IFAPA-La Mojonera a -80 °C en forma de propágulos en suspensión de glicerol al 15% en agua estéril. Para ello, se descongeló la suspensión y se sembró con un asa de siembra en dos placas Petri con PDA (Potato Dextrose Agar, Laboratorios MICROKIT), las placas se almacenaron en la Micoteca (25 °C y oscuridad continuas) durante 72 horas.

Además de los tubos con el hongo original, se disponía del mismo hongo que había sido repicado 24 veces desde 2014 en una placa Petri. De dicha placa, se repicó nuevamente con ayuda de una lanceta a otras dos placas de PDA en campana extractora, con el fin de compararlas con la muestra congelada a -80 °C.

Paralelamente, se desinfectaron 15 semillas de pepino de la variedad Marketer en 50 mL de lejía al 50%, y permanecieron sumergidas durante 20 min en agitación a 500 rpm. Las semillas se lavaron 3 veces con agua corriente bajo el grifo, y se depositaron en una cámara húmeda formada por dos bandejas de plástico y papel de filtro humedecido entre ellas. Finalmente se dejaron las semillas en incubación en oscuridad a 25 °C durante 3 días para que pregerminaran, es decir, conservarlas en ambiente húmedo para que se forme la radícula. Pasado este tiempo, se seleccionaron aquellas semillas con la radícula más desarrollada.

Tanto las 2 placas con el hongo original, como las otras 2 placas con el hongo repicado, se mantuvieron en incubación durante una semana en la Micoteca. Tras ello, con un sacabocados de 6 mm, se tomó una muestra de una de las réplicas de cada tipo, y se depositaron en una placa con medio Agar-Agua al 1,5% (AA). El trozo de agar con el hongo se colocó en el centro bocabajo, y en la periferia se depositaron 3 semillas de pepino con la radícula ya formada (**Figura 3**).



Figura 3: Placa Petri con medio AA con el hongo *Forc* repicado en el centro, junto con tres semillas de pepino pregerminadas.

Las placas se dejaron crecer incubando a 25 °C y en oscuridad para permitir que el micelio contactase con las raíces de las plantas. A los 4 días se llevó a cabo la primera observación directa bajo el microscopio de fluorescencia, utilizando el objetivo 20x. Para ello se colocó la placa Petri por su base y se fueron enfocando una a una las raíces de las semillas infectadas, en ocasiones se quitaba la tapa de la placa, para una mejor visualización. Este proceso se repitió a lo largo de dos semanas, realizando observaciones cada 2/3 días donde se comprobaba que el hongo seguía vivo y activo colonizando los tejidos vegetales. Los parámetros que se estudiaron mediante la visualización en microscopio de fluorescencia fueron los siguientes: adherencia a la epidermis, penetración y avance intercelular, y penetración intracelular del hongo.

3.3 Estudio de colonización radicular en plantas sembradas en vermiculita estéril

Para evaluar la colonización radicular de *Forc* T3i1 en cultivos de plantas, se diseñó un ensayo utilizando 12 variedades distintas de calabaza y una de pepino, todas ellas inoculadas con el hongo. Las variedades de semillas de calabaza que se emplearon con sus correspondientes códigos son las siguientes (**Tabla 1**):

Grupo de Siembra	Variedad de Calabaza	Código
S1	Ercole	Er
	Zadok	Zad
	Abobrina	Ab
S2	F-90	F90
	Synergie	Syn
	Cobalt	Cob
	Shintosa Camel force	Shin
S3	Squash Routpower	Sq
	Azman RZ	Az
	Marketmore	Mark
	Affyne RZ	Aff
	RS841	RS

Tabla 1: Listado de variedades de semilla de calabaza utilizadas para el ensayo de colonización radicular, divididas en tres grupos según se utilizaron en el tiempo.

3. Materiales y Métodos

Adicionalmente, se utilizaron semillas de Pepino Marketer lote nº39 (Pep) susceptibles al hongo, con el fin de contrastar los resultados de colonización con las semillas de calabaza que son resistentes al patógeno. Para este experimento, las semillas se dividieron en 3 grupos anotados como S1, S2 y S3 en la **Tabla 1**.

Las semillas fueron desinfectadas en 50 mL de lejía al 50%, y se pregerminaron en una cámara húmeda empleando el mismo procedimiento especificado en el apdo 3.2. Pasadas 72 horas se llevó a cabo la siembra, tiempo al cual en la mayoría de las variedades había emergido la radícula. Del total de 8 semillas pregerminadas de cada variedad que se depositaron en la cámara húmeda, se escogieron las 6 que presentaban un mayor grado de desarrollo, o que mostraban mayor turgencia. Las semillas se sembraron individualmente en macetas de 250 mL perforadas para permitir el drenaje de agua, que contenían vermiculita estéril como sustrato inerte. La vermiculita se esterilizó previamente en autoclave durante 30 minutos a 121 °C y se distribuyó en las macetas de plástico. Las macetas con las semillas se regaron con abono 15:15:15 (nitrógeno: fosfato: potasa) (Haifa, Israel), de tal forma que, para cada variedad de semilla había 6 repeticiones. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo con 14 h de luz/ 10 h de oscuridad y temperatura entre 25 y 28 °C durante dos semanas.

Para la preparación del inóculo se partió de un cultivo de *Forc* T3i1 en dos placas Petri con medio PDA incubado durante dos semanas a 25 °C en oscuridad. De cada placa, se extrajeron 20 fragmentos del agar con el hongo empleando un sacabocados de 6 mm de diámetro, que se depositaron en un Erlenmeyer de 1 L de capacidad con 0,5 L de medio PDB (Oxoid, R.U.). Los dos matraces se incubaron a 25 °C y en oscuridad a 125 rpm en agitación orbital durante dos semanas. Transcurrido este tiempo se purificó el inóculo de uno de los dos matraces Erlenmeyer, repartiendo su contenido en 8 tubos Falcon de 50 mL de capacidad y se centrifugó el contenido a 4700 rpm durante 20 minutos a 15 °C con el objetivo de separar la biomasa fúngica del medio PDB. Tras desechar el sobrenadante, se enrasaron los tubos Falcon a 50 mL con agua estéril mediante el uso de una pipeta estéril para un segundo ciclo de centrifugado. Nuevamente se desechó el sobrenadante y se enrasaron los tubos con agua estéril para un tercer y último centrifugado. Tras desechar el sobrenadante y enrasar con agua estéril, se procedió a calcular la cantidad de inóculo necesaria para obtener una carga de inóculo de 6×10^7 UFC por maceta de 250 mL, utilizando una cámara de recuento Thoma (**Figura 4**).

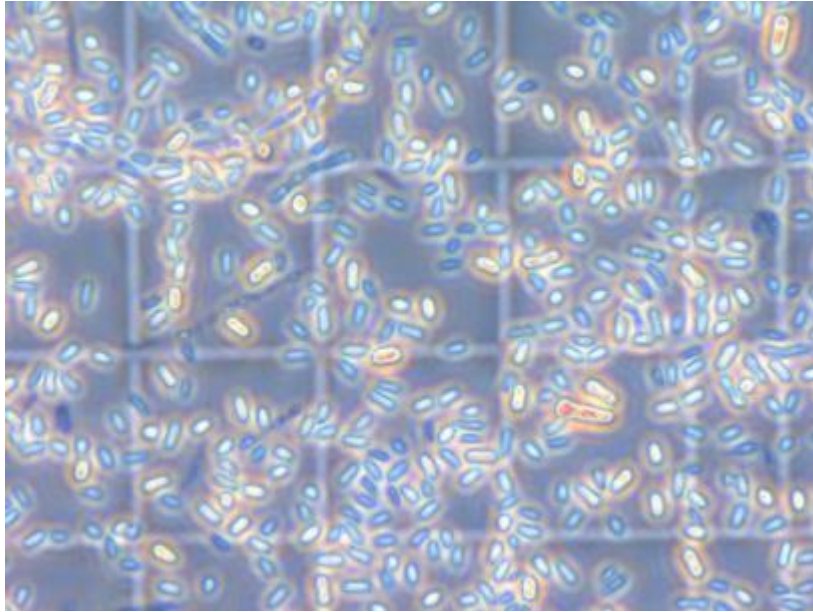


Figura 4: Imagen de una muestra del inóculo de un tubo Falcon en la cámara de recuento Thoma, visto desde un microscopio óptico a un aumento de 20x.

Una vez obtenida la suspensión de conidias, empleando una pipeta estéril, se inocularon mediante riego con la suspensión mencionada aquellas variedades germinadas con 25 mL de inóculo cada una. Teniendo en cuenta que el día de inoculación cuenta como día 0, se realizó una primera lectura de las raíces infectadas a los 6 días post inoculación (6 dpi), y una segunda lectura a los 12 dpi. La lectura de las raíces consiste en un procedimiento destructivo en el que se escinde la raíz del tallo y se lava con agua destilada retirando los restos de vermiculita y las hifas del hongo no adheridas a la raíz. Mediante un bisturí, se obtienen varias secciones de las raíces de aproximadamente 5 cm cada una, y se colocan en un portaobjetos para su visualización bajo el microscopio de fluorescencia (**Figura 5**). Para cada lectura, se tomaron la mitad de las plantas de cada variedad germinada que comprendía entre 6 y 8 plantas por especie y día, debido al consumo de tiempo requerido para el procesado de las muestras y observación al microscopio.

3. Materiales y Métodos



Figura 5: Preparado de las raíces de la variedad de calabaza RS841 seccionada en dos partes para su visualización bajo el microscopio de fluorescencia.

Bajo el microscopio se comprobaba el estado del proceso de colonización radicular, distinguiendo 3 etapas:

- **Etapa I:** predominado por la ausencia de interacción, en el que se observan conidias germinadas o sin germinar en la superficie epidérmica radicular, pero sin la presencia de hifas en contacto con las raíces.
- **Etapa II:** inicio de la interacción, es decir, se comienzan a observar hifas cortas no ramificadas en la epidermis radical, pudiendo mostrar apresorios.
- **Etapa III:** existe una evidente colonización que puede manifestarse por desarrollo hifal en los espacios intercelulares o penetración intracelular de la hifa en células corticales o epidérmicas.

Se tomaron fotos de la visualización de cada muestra (**Figura 6**), buscando evidencias de adherencia y/o colonización de *Forc* a lo largo de las raíces, y anotando los resultados obtenidos.

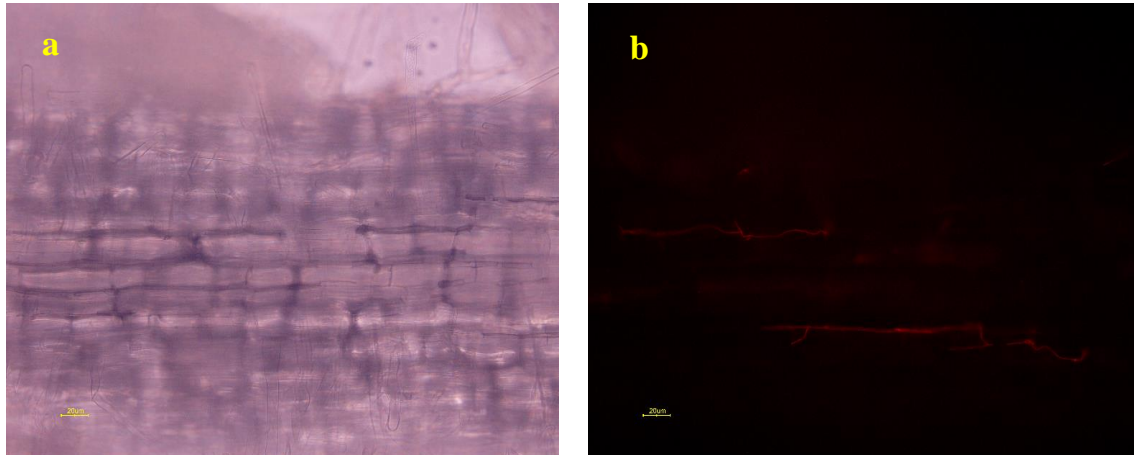


Figura 6: Imagen vista desde el microscopio de fluorescencia con un aumento de 20x de la raíz de pepino infectada por el hongo *Forc*. **a)** Vista al microscopio sin filtro de fluorescencia; **b)** Imagen de la misma sección del tejido de la raíz pero vista bajo el filtro verde de fluorescencia, que permite la detección del micelio del hongo (en rojo) adherido a la pared celular.

3.4 Estudio del comportamiento del hongo con exudados radiculares

Para la realización de este ensayo se escogieron aquellas semillas de calabaza que previamente habían germinado en el experimento anterior (**Tabla 2**), adicionalmente se utilizaron semillas de pepino.

Variedad de Calabaza	Código
Zadok	Zad
F-90	F90
Synergie	Syn
Cobalt	Cob
Shintosa Camel force	Shin
RS841	RS

Tabla 2: Variedades de semilla de calabaza seleccionadas para el ensayo de germinación de conidias en exudados de raíz.

3. Materiales y Métodos

Todas las semillas se desinfectaron en 50 mL de lejía al 50% durante 20 min y se depositaron en una cámara húmeda hasta que formaron las radículas. Posteriormente, se sembraron 3 semillas de cada variedad en macetas de 250 mL con vermiculita estéril y se regaron con abono, tal y como se hizo en el ensayo anterior. Las plantas se dejaron crecer 7 días en la cámara de cultivo hasta que alcanzaron tres hojas verdaderas, en las condiciones anteriormente citadas.

Las plantas se retiraron de las macetas y se lavaron sus raíces generosamente con agua destilada para eliminar los restos de vermiculita, seguidamente se introdujeron en viales con 40 mL de agua estéril. Los viales se taparon con papel de aluminio y se dejaron en la cámara de crecimiento durante 24 horas. Se prepararon tres réplicas más con extracto de turba, para su obtención se tomó 1 gramo de muestra estéril por vial y se enrasaron con 40 mL de agua estéril. Los recipientes se dejaron en agitación orbital a 125 rpm durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se determinó la conductividad eléctrica (expresada en ms/cm) de los exudados mediante el uso de un conductivímetro MILWAUKEE, y se filtraron 990 μ L de las soluciones con ayuda de un filtro estéril de 0.22 μ m en microtubos de 1,5 mL (Scheffknecht *et al.*, 2006).

A continuación se añadió a los microtubos un volumen de inóculo que se determinó tras el recuento del número de conidias en la cámara Thoma bajo visualización directa con microscopio óptico. Finalmente se tomó un volumen de 10 μ L conteniendo 8×10^5 UFC. Todo este proceso fue llevado a cabo bajo una campana de extracción y en condiciones de asepsia para evitar posibles contaminaciones en los tubos. Adicionalmente, se inocularon tres réplicas con H₂O estéril para utilizarlas como muestras control. Una vez inoculados los tubos, se almacenaron 24 h en oscuridad a 25 °C.

Se realizaron observaciones de los tubos bajo visualización directa con microscopio óptico al alcanzar 1 día tras la inoculación (dti), 5 dti y 9 dti; con el objetivo de estudiar la germinación de las conidias a lo largo del tiempo en los distintos tipos de exudados. Para tal fin se realizó un conteo de 50 conidias por cada una de las 3 réplicas y se anotó su grado de desarrollo mediante un índice de germinación (IG) del hongo establecido exprofeso con el siguiente criterio:

- **Grado 0:** la espora del hongo no ha germinado y presenta una forma ovalada.
- **Grado 1:** la conidia empieza a emitir un tubo germinativo, y sigue presentando forma ovoide.
- **Grado 2:** el tubo germinativo empieza a desarrollarse.
- **Grado 3:** la longitud del tubo alcanza una longitud cinco veces mayor a la de la espora.
- **Grado 4:** la espora ha empezado a multiplicarse y a formar ramificaciones.

3.5 Análisis de datos

Para comprobar que los resultados de IG obtenidos eran diferentes significativamente, se procedió a realizar un análisis estadístico para las lecturas de cada día de conteo, mediante test ANOVA seguido de un test de contraste de rangos múltiples empleando el modelo de la diferencia mínima significativa (LSD). Previamente al análisis fue comprobada la distribución normal y homocedasticidad de los datos. Todo el estudio estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Statistix 9.0. (Analytical software, EE.UU.).

3.6 Equipo de microscopia de fluorescencia

Las observaciones se llevaron a cabo empleando un microscopio de fluorescencia ubicado en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación IFAPA-La Mojonera, consistente en un microscopio Olympus (Japón) BX40 equipado con una bombilla de mercurio y filtro de excitación Olympus de banda ancha verde (BP510-550), espejo dicroico DM570, y filtro barrera BA591. Al microscopio se encontraba acoplada una cámara digital NIKON DMX-1200f conectada a un ordenador personal para la captura de imágenes. El programa con el que se realizó la toma de imágenes fue el ACT1 Versión 2.63 (2000) (Nikon, Japón).

4. Resultados

4.1 Comprobación de la capacidad de colonización de *Forc* T3i1 de las raíces en medio de cultivo agarizado

Las placas Petri con las semillas de pepino y el hongo original repicado, se empezaron a observar bajo el microscopio de fluorescencia cuando existían evidencias macroscópicas de contacto entre las raíces y el micelio. Al quinto día ya se apreciaba cómo el hongo iba colonizando poco a poco las paredes de las raíces, sin llegar a existir penetración en los tejidos. Paulatinamente, las hifas de *Forc* desviaron su crecimiento radial inicial desde el centro de las placas hasta colocarse de forma paralela al eje longitudinal de las raíces. Esto pudo haber sucedido de forma pasiva al adherirse el hongo a la epidermis radical y desplazarse conjuntamente. Este comportamiento difiere del observado posteriormente en el ensayo de colonización radicular en sustrato, al crecer las raíces formando estructuras tridimensionales.

Las observaciones se realizaron con claridad gracias a la técnica de fluorescencia, tal y como se puede apreciar en la **Figura 7**, confirmando la persistencia de la capacidad de *Forc* para crecer de forma normal, y además, expresar la proteína *DsRed2* tras su almacenamiento en un congelador a -80 °C. El hongo mostró una clara fluorescencia roja que permitió distinguirlo con facilidad de la epidermis y subepidermis radical. Además, el microscopio cuenta con filtros para anchos de espectro de los colores azul y verde, que sirvieron para confirmar que se observaba al patógeno y no a las células de la planta, ya que no emite fluorescencia en estos colores, cosa que sí sucede con las últimas.

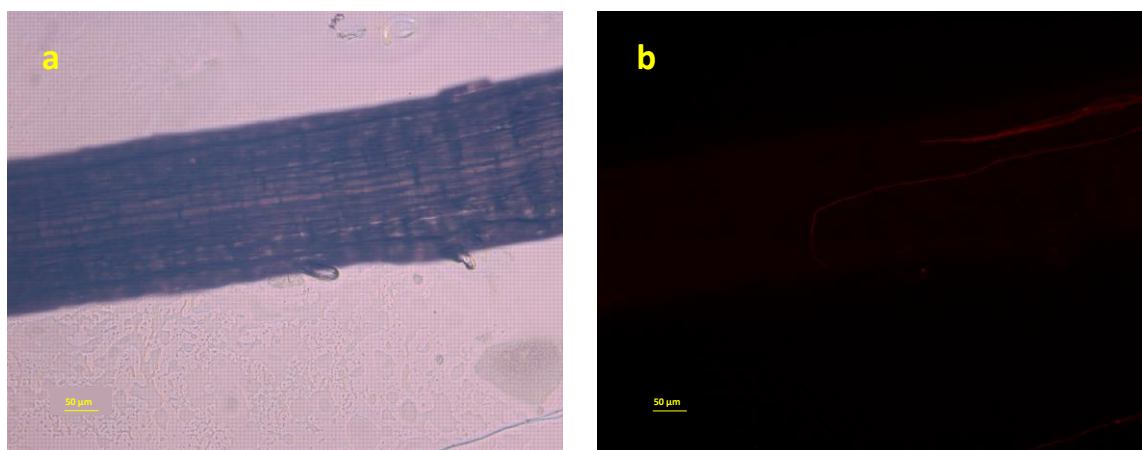


Figura 7: Imagen vista desde el microscopio de fluorescencia con un aumento de 10x (barra de escala de 50µm) de la raíz de pepino infectada por el hongo *Forc*. **a)** Vista de la raíz sin filtro de fluorescencia; **b)** Imagen de la misma sección del tejido de la raíz pero vista bajo el filtro verde de fluorescencia, que permite la detección del micelio del hongo (en rojo) adherido a la pared celular.

El ensayo se llevó a cabo durante 10 días para seguir la evolución de la interacción micelio-raíz. El hongo llegó a mostrar claras evidencias de colonización de las raíces en forma de adherencia a las paredes, y en algunos casos se pudo discernir penetración dentro de las raíces. Aunque es importante mencionar que no se llegó a observar penetración intracelular.

4.2 Estudio de colonización radicular en plantas sembradas en vermiculita estéril

Para el experimento en sustrato inerte se obtuvieron unos resultados muy similares a los del ensayo en medio de cultivo agarizado para ambas especies de cucurbitáceas. De las variedades sembradas en vermiculita, sólo germinaron las semillas de pepino y la mitad de las variedades de calabaza. La inoculación se llevó a cabo pasadas dos semanas de la incubación de los matraces con el hongo *Forc* T3i1. Transcurridos 6 días post inoculación (6 dpi), se realizó la primera lectura de las raíces de la mitad de las plantas germinadas de cada variedad; y a los 12 dpi se llevó a cabo la segunda lectura de las plantas restantes. Los resultados de este ensayo se fueron anotando según la etapa de colonización del micelio a las raíces de las muestras.

Para la lectura de las raíces sólo se realizaron preparaciones de aquellas variedades que fueron capaces de germinar en la cámara de cultivo: Pep, Zad, F-90, Shin, Syn, Cob y RS. En la primera lectura (6 dpi), las raíces examinadas de las distintas variedades mostraron adherencia del micelio de *Fusarium* tanto a la epidermis como al córtex del tejido mediante la presencia de apresorios (**Figura 8, 9, 10 y 11**). Sin embargo, únicamente las variedades Zad, F-90 y RS mostraron signos de avance de las hifas por los espacios intercelulares.

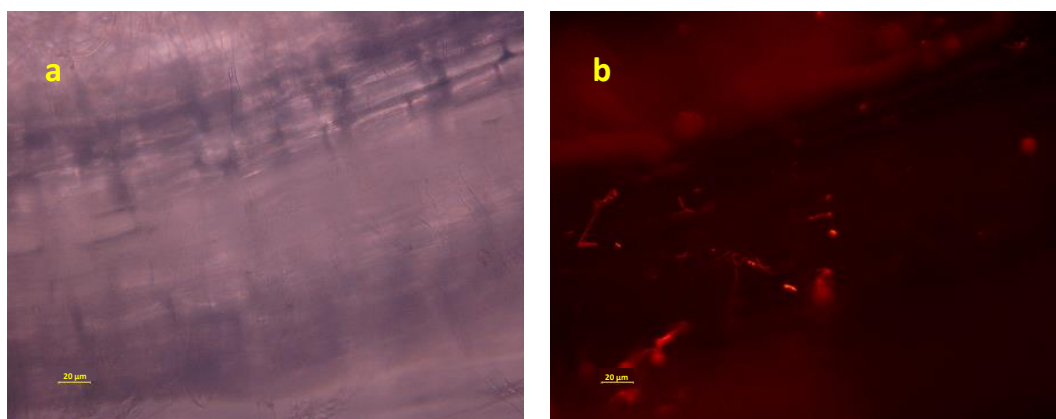


Figura 8: Imagen vista desde el microscopio de fluorescencia con un aumento de 20x (barra de escala de 20µm) de las raíces de pepino infectadas por el hongo *Forc*, en la primera lectura (6 dpi). La imagen de la izquierda (a) fue tomada con un microscopio óptico convencional; a la derecha (b), se puede ver la misma imagen pero bajo microscopía de fluorescencia. Se detecta adhesión de hifas poco desarrolladas.

4. Resultados

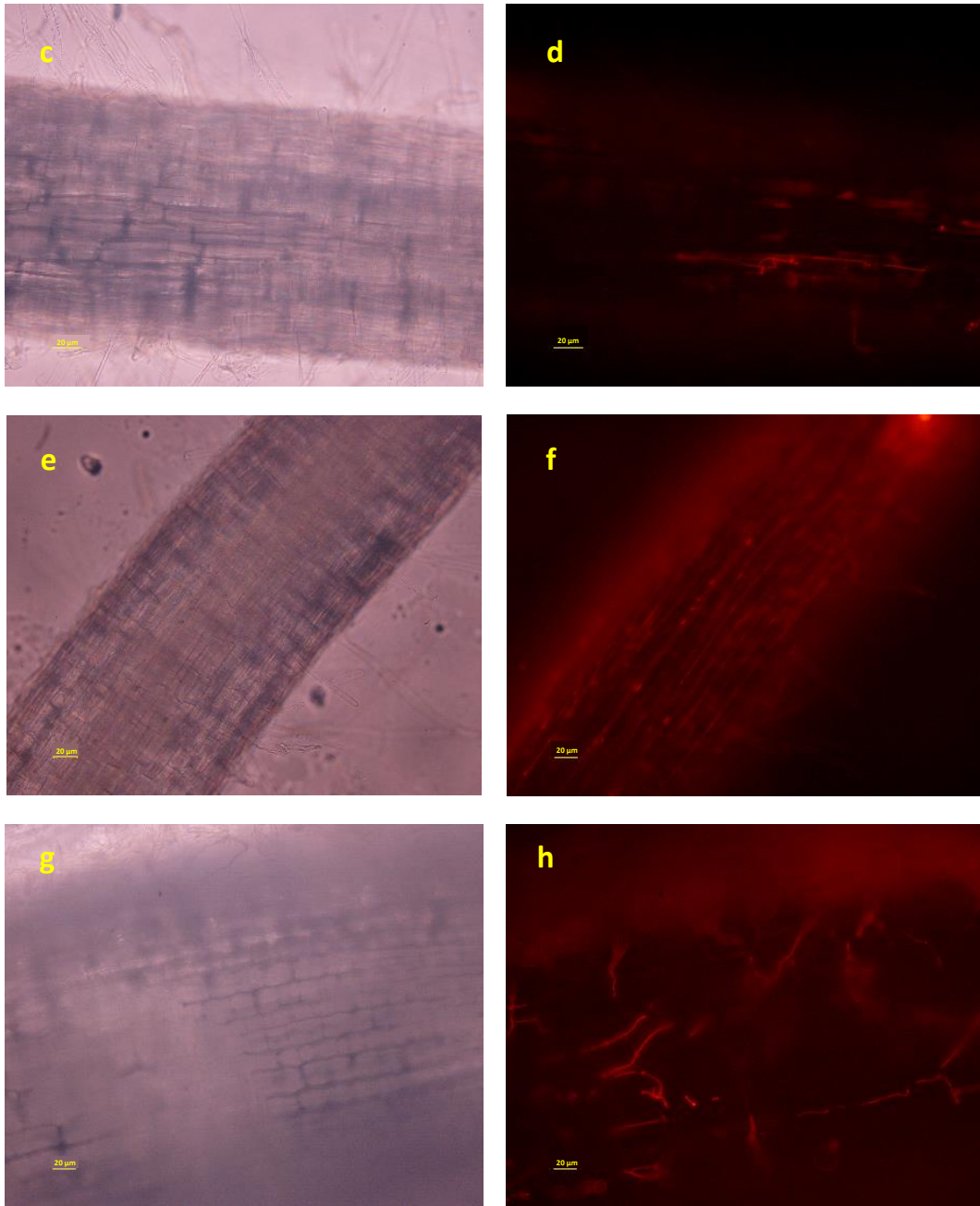


Figura 9: Imagen vista desde el microscopio de fluorescencia con un aumento de 20x (barra de escala de 20µm) de las raíces de las distintas variedades infectadas por el hongo *Forc*, en la primera lectura (6 dpi). Las imágenes de la izquierda (c, e y g) muestran la sección del tejido visto con un microscopio óptico convencional; a la derecha (d, f y h), mismas imágenes pero bajo microscopía de fluorescencia. Las variedades se muestran en el siguiente orden: Zad (c y d), F-90 (e y f) y Shin (g y h). Todas las imágenes muestran adherencia de las hifas a las paredes de la raíz; mientras que Zad y, F-90 presentan penetración intercelular, en la que parece que las hifas avanzan por el interior del tejido bordeando las células.

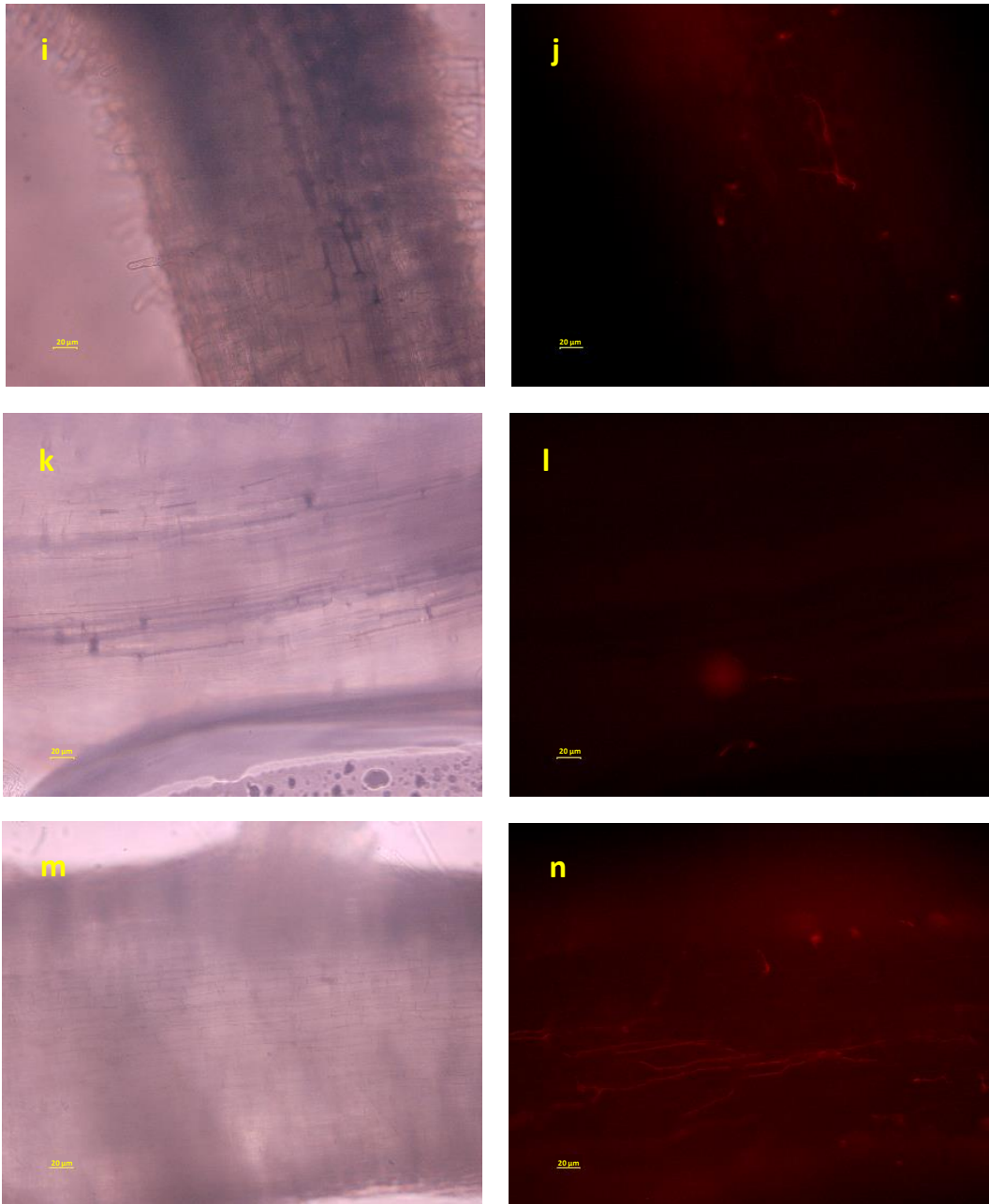


Figura 10: Imagen vista desde el microscopio de fluorescencia con un aumento de 20x (barra de escala de 20µm) de las raíces de las distintas variedades infectadas por el hongo *Forc*, en la primera lectura (6 dpi). Las imágenes de la izquierda (i, k y m) muestran la sección del tejido visto con un microscopio óptico convencional; a la derecha (j, l y n), mismas imágenes pero bajo microscopía de fluorescencia. Las variedades se muestran en el siguiente orden: Syn (i y j), Cob (k y l), RS (m y n) y Sq (o y p). Todas las imágenes muestran adherencia de las hifas a las paredes de la raíz; mientras que RS presentan penetración intercelular, en la que parece que las hifas avanzan por el interior del tejido bordeando las células.

4. Resultados

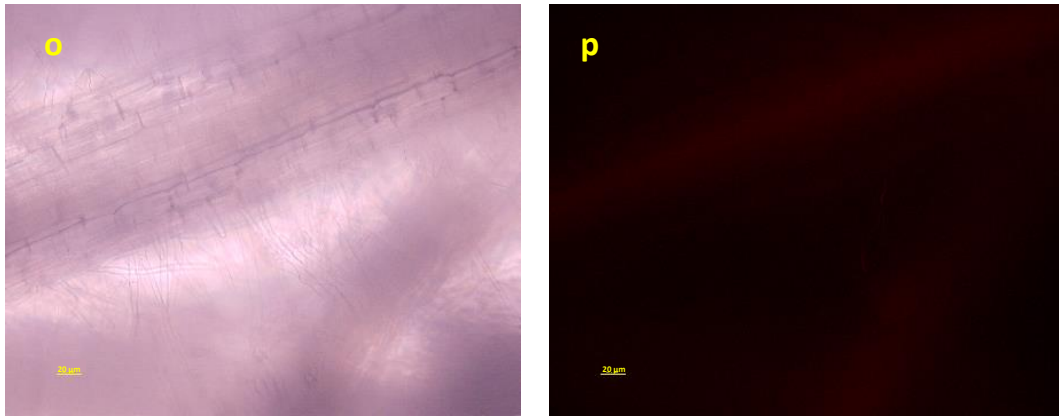


Figura 11: Imagen vista desde el microscopio de fluorescencia con un aumento de 20x (barra de escala de 20µm) de las raíces de Sq infectadas por el hongo *Forc*, en la primera lectura (6 dpi). La imagen de la izquierda (o) muestra la sección del tejido visto con un microscopio óptico convencional; a la derecha (p), misma imagen pero bajo microscopía de fluorescencia. Se muestran adherencia de las hifas a las paredes de la raíz, pero no parece existir penetración.

A los 12 dpi para todas las variedades, las raíces examinadas mostraron abundante micelio adherido tanto a la corteza como a la epidermis radical, pudiendo llegar a apreciarse colonización en el interior de las raíces y avance de las hifas por los espacios intercelulares. Incluso se llegó a detectar penetración intracelular en pepino, en cuyas raíces las hifas alcanzaron el interior de las células vegetales y quedaron confinadas dentro del perímetro delimitado por ésta. Los pelos absorbentes de la raíz aparentemente nunca fueron colonizados por hongos. Los resultados obtenidos de esta segunda lectura se muestran en las **Figuras 12, 13 y 14**:

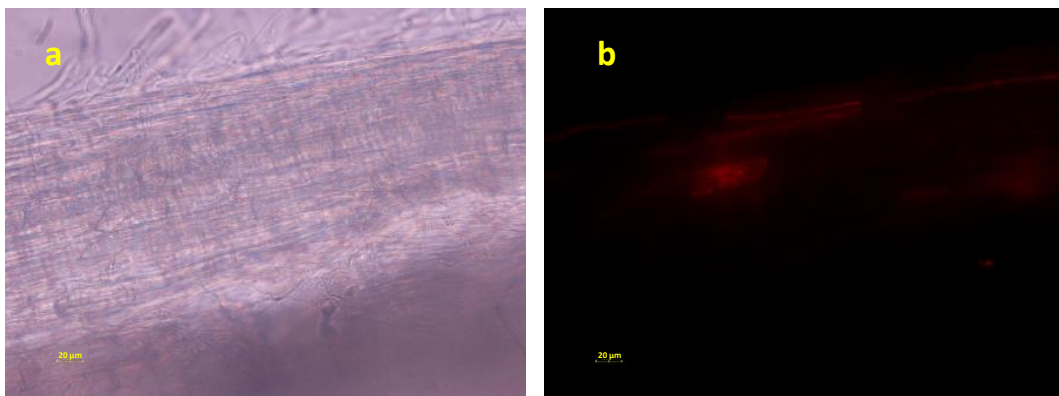


Figura 12: Imagen vista desde el microscopio de fluorescencia con un aumento de 20x (barra de escala de 20µm) de las raíces de pepino infectadas por el hongo *Forc*, en la segunda lectura (12 dpi). La imagen de la izquierda (a) muestra la sección del tejido visto con un microscopio óptico convencional; a la derecha (b), se puede ver las misma imagen pero bajo microscopía de fluorescencia. En las raíces de pepino se llegó a observar penetración intracelular, quedando la hifa confinada dentro de la célula vegetal como se muestra en la imagen b.

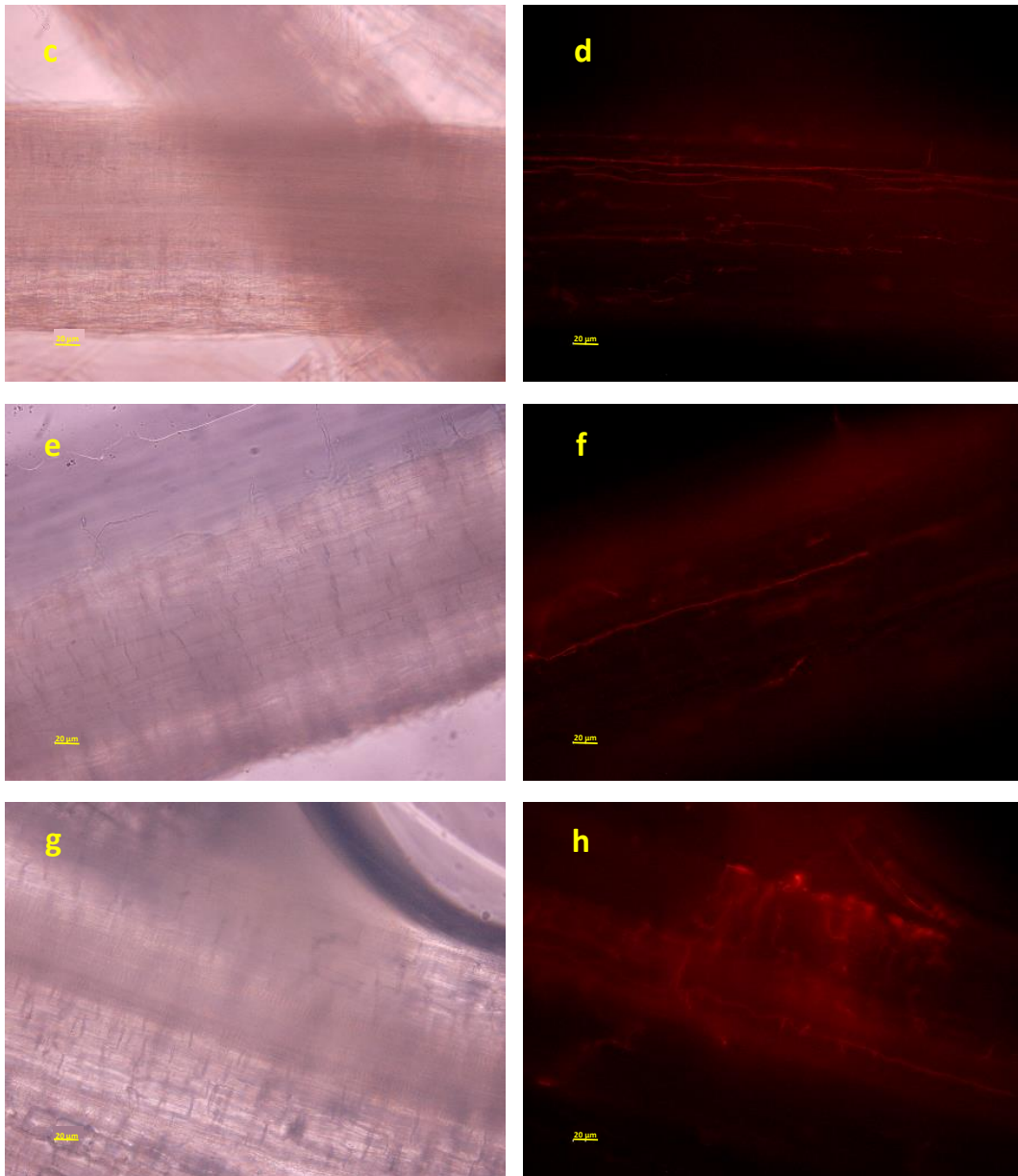


Figura 13: Imagen vista desde el microscopio de fluorescencia con un aumento de 20x (barra de escala de 20µm) de las raíces de las distintas variedades estudiadas infectadas por el hongo *Forc*, en la segunda lectura (12 dpi). Las imágenes de la izquierda (c, e, y g) muestran la sección del tejido visto con un microscopio óptico convencional; a la derecha (d, f, y h), se pueden ver las mismas imágenes bajo microscopía de fluorescencia. Las variedades se muestran en el siguiente orden: Zad (c y d), F90 (e y f) y Syn (g y h). Todas las imágenes muestran adherencia de las hifas a las paredes de la raíz, además de penetración intercelular.

4. Resultados

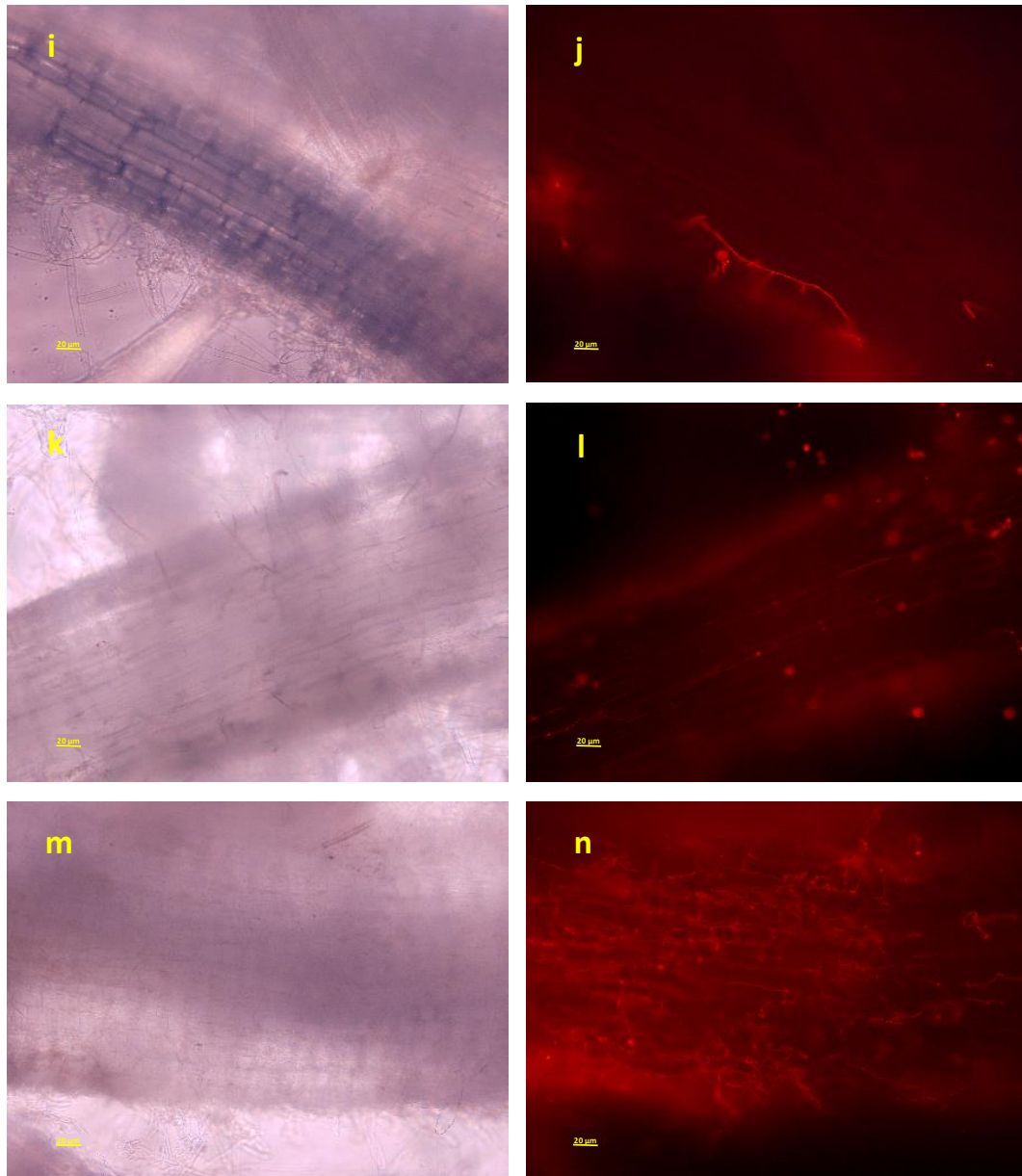


Figura 14: Imagen vista desde el microscopio de fluorescencia con un aumento de 20x (barra de escala de 20µm) de las raíces de las distintas variedades infectadas por el hongo *Forc*, en la segunda lectura (12 dpi). Las imágenes de la izquierda (i, k y m) muestran la sección del tejido visto con un microscopio óptico convencional; a la derecha (j, l y n), mismas imágenes pero bajo microscopía de fluorescencia. Las variedades se muestran en el siguiente orden: Cob (i y j), RS (k y l) y Sq (m y n). Se muestra adherencia de las hifas a las paredes de la raíz y penetración intercelular.

4.3 Estudio de comportamiento del hongo con exudados radiculares

Antes de realizar el recuento de conidias, se procedió a medir la conductividad eléctrica de los distintos tipos de exudados mediante un conductivímetro (**Tabla 3**):

Variedad	Conductividad [ms/cm]
H₂O	0.000
Syn	0.000
Pep	0.007
Turba	0.177
Zad	0.193
F-90	0.243
Cob	0.367
Shin	0.893
RS	0.893

Tabla 3: Conductividad eléctrica [ms/cm] de los exudados radiculares de las distintas variedades que se han utilizado en este experimento, incluido el extracto de turba. Se muestran valores medios de tres repeticiones.

Los valores alcanzados de conductividad eléctrica en agua estéril y en plantas menos desarrolladas como Syn y Pep, fueron prácticamente nulos, lo que significa que las muestras carecían de exudados. En cambio, las plantas que alcanzaron estados más desarrollados, es decir, que tuvieron un crecimiento mayor mostraron valores de conductividad elevados. Ofreciendo una mayor disponibilidad de exudados para la germinación de las esporas del hongo.

4. Resultados

Los resultados obtenidos de los distintos días de lectura se muestran en la **Figura 13**:

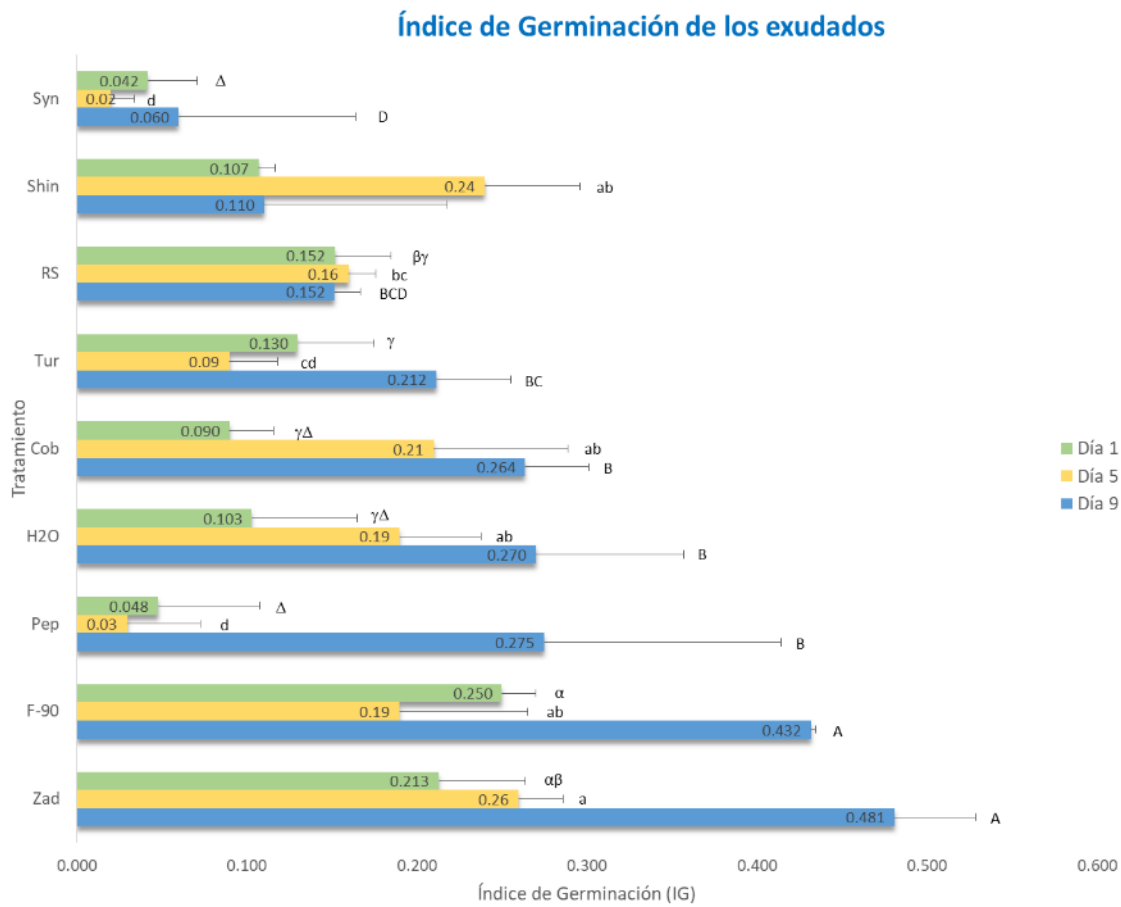


Figura 13: Índice de germinación de *Forc* para cada tratamiento en los diferentes días de lectura. Las barras coloreadas muestran la media de los valores obtenidos en las distintas réplicas (n=3); la desviación estándar de dichos datos se encuentra representada por las barras de error. Las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95%, por lo que se encuentran asignadas en un mismo grupo de homogeneidad.

De forma general, se aprecia una evolución progresiva en la germinación y el crecimiento de las conidias a lo largo de los días. Es decir, el hongo fue capaz de desarrollarse a pesar de la ausencia de plantas, y formó hifas ramificadas. Sin embargo, el porcentaje de conidias sin germinar seguía siendo bastante alto, por lo que los exudados no parecen ser nutriente suficiente para la cantidad de hongo inoculada. Incluso en agua estéril se alcanzaron valores de germinación bastante elevados, mucho mayores que algunos exudados de plantas como Syn, Shin y RS.

5. Discusión

5.1 Comprobación de la capacidad de colonización de *Forc* T3i1 de las raíces en medio de cultivo agarizado

Tras la prueba de colonización de las raíces de pepino por el hongo *Forc* en medio Agar-Agua, los resultados demostraron que, a pesar de haberse mantenido a -80 °C durante 4 años en un congelador, éste mantenía intacta la capacidad de crecimiento y la de expresión de la proteína *DsRed2* que le permite emitir fluorescencia de color rojo. Tal y como se pudo observar bajo el microscopio de fluorescencia, el hongo fue capaz de colonizar de forma activa las raíces de pepino adhiriéndose a las paredes del tejido. También se llegó a apreciar penetración intercelular, en la que las hifas crecían a lo largo de las raíces abriéndose paso entre las células. Una vez confirmado que el patógeno era capaz de crecer con normalidad se procedió a la realización de los ensayos posteriores. Estos resultados son similares a los obtenidos en trabajos anteriores realizados con el mismo transformado del hongo (Muela Jordán L., 2015).

5.2 Estudio de colonización radicular en plantas sembradas con vermiculita estéril

Para este ensayo, sólo germinaron la mitad de las variedades que se sembraron inicialmente. Esto pudo deberse principalmente, a una posible pérdida de la viabilidad de sus semillas. En la primera lectura de las raíces de las plantas que se llevó a cabo 6 dpi, la visualización de los tejidos bajo el microscopio de fluorescencia mostraron que el hongo fue capaz de colonizar todas las raíces tanto las de pepino (susceptibles) como las de calabaza (resistentes). Esto sucedió principalmente en las plantas que consiguieron un mayor desarrollo, en las que además de adhesión a la epidermis, el hongo fue capaz de llegar a la subepidermis y empezar a crecer entre las células radicales, similar a lo ya observado en trabajos anteriores realizados en plantas de tomate con *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Nahalkova *et al.*, 2008), y en tomate y mostaza con *Forc* (Muela Jordán L., 2015).

En cambio, en la segunda lectura que se realizó 12 dpi, las hifas en las plantas de pepino mostraron penetración intracelular, es decir, el hongo fue capaz de colonizar algunas células vegetales tal y como se observa en la **Figura 9 b**. Este comportamiento es contrario al observado en otras cucurbitáceas como la sandía y el melón, donde ni *F. oxysporum* f. sp. *niveum* ni *Forc* fueron detectados dentro de las células radicales respectivamente (Cohen *et al.*, 2015). Dicho comportamiento sólo se había visto hasta ahora en plantas resistentes al patógeno como *Solanum lycopersici* (De Cara-García M., 2017). Al contrario de lo que se pensaba en un principio y dado

que sólo se ha observado penetración intracelular en pepino y no en calabaza, es posible que éste sea un signo de susceptibilidad frente al hongo *Forc*, entre especies de cucurbitáceas.

5.3 Estudio de comportamiento del hongo con exudados radiculares

Tras la obtención de los resultados del recuento de conidias germinadas de *Forc* en los exudados de raíz y su posterior análisis estadístico, podemos deducir que pese a que las diferencias entre los distintos tratamientos son significativas, no parece existir una relación clara entre la cantidad de exudados (directamente proporcional a la conductividad eléctrica) y el Índice de Germinación (IG) de las conidias del hongo.

A pesar de que las variedades Zad y F-90 muestran unos resultados satisfactorios y coherentes con la hipótesis inicial, el tratamiento con Agua estéril que carece de nutrientes para el patógeno, alcanzó altos niveles de IG en los distintos días de lectura. Parece que *Forc* es capaz de germinar y crecer por su propia cuenta pese a no tener nutrientes en el medio por varios días.

Es posible que los datos no sean los esperados porque el criterio que se utilizó para la obtención de los exudados de las plantas fue que éstas desarrollaran tres hojas verdaderas. Pero es importante señalar que no todas las variedades alcanzaron dicho estado a la vez, por lo que, llegado el momento de retirarlas de la cámara de cultivo, las plantas presentaban tamaños dispares. Siendo Zad y F-90 las que alcanzaron un tamaño considerable, en contraste con Syn y Pep, que recientemente habían formado sus 3 hojas verdaderas. Por lo que parece lógico pensar que para estudios posteriores, el criterio de selección del mejor momento de obtención de los extractos venga determinado por el tamaño de las plantas y no por el número de hojas.

Adicionalmente, es posible pensar que el número de conidias que se contaron fue demasiado bajo para alcanzar unos datos estadísticos más fiables. Es decir, se contaron un total de 50 conidias por réplica (150 conidias por tratamiento), pero en cada muestra el porcentaje de conidias sin germinar era muy abundante. Es importante comentar que en algunas muestras, las conidias empezaron a crecer formando conglomerados no disgregables, y no era posible realizar su recuento con la Cámara Thoma, por lo que el conteo se realizó para aquellas esporas en suspensión (**Figura 14**).

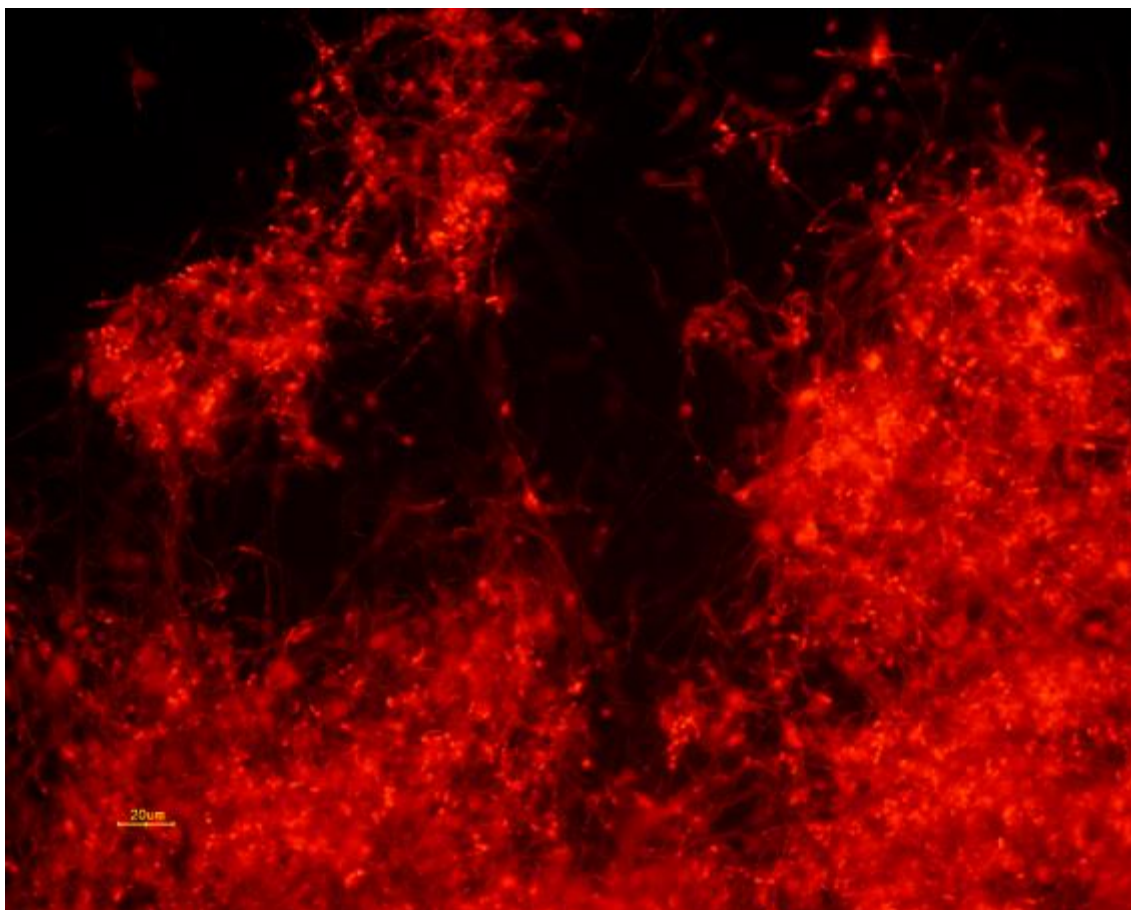


Figura 14: Imagen de una muestra de uno de los microtubos de los exudados procedentes de RS visto bajo microscopio de fluorescencia a 20x el día 9 de lectura, en la que se observa conidias que se han aglomerado y han empezado a germinar. La fluorescencia roja permite comprobar que el hongo sigue siendo viable.

6. Conclusiones

De los resultados obtenidos en este trabajo se derivan las siguientes conclusiones:

- Tras permanecer 4 años a -80°C, *Forc* T3i1 se mantiene viable y con capacidad para expresar la proteína *DsRed2* que le permite emitir fluorescencia roja.
- *Forc* infecta por igual las raíces de distintos tipos de cucurbitáceas de forma inespecífica como el pepino y diversas variedades de calabaza.
- El grado de colonización a nivel tisular en la raíz no permite encontrar diferencias entre distintas especies anfitrionas (ya sean susceptibles o resistentes).
- No se observa efecto de los exudados radiculares de las especies estudiadas sobre la germinación de conidias y crecimiento micelial, cuando la presencia de conidias es elevada.

7. Propuestas de futuro

Los resultados obtenidos en este trabajo, ayudan a conocer mejor los mecanismos de actuación de *Forc*. Sin embargo, aún se desconoce por qué especies de cucurbitáceas como el pepino son susceptibles a la enfermedad que produce el hongo, mientras que otras plantas muy similares del mismo género como la calabaza son resistentes. Por ello, sería interesante plantear más estudios que impliquen el uso del transformado fluorescente *Forc* en distintas especies de cucurbitáceas tales como la sandía y el melón, con el fin de descubrir qué hace que unas especies sean resistentes y otras no.

Desde un punto de vista genético, se podrían realizar estudios de transcriptómica empleando técnicas como el RNA-seq. Esto nos permitiría conocer los genes que se expresan durante la interacción raíz-hongo, y en qué medida.

Para el estudio de germinación de conidias de *Forc* en presencia de exudados radiculares, se podría realizar un nuevo diseño experimental que se ajuste en mayor medida a las características del hongo. Los resultados obtenidos en este trabajo se podrían mejorar ahora que conocemos mejor algunos de los parámetros que afectan al patógeno (tamaño de la planta, volumen de inóculo, tamaño de muestra, etc.).

8. Bibliografía

- Alcázar, M. G., Añaños, M., Blanco, R., & Cifuentes, D. (2006). Grupos de Compatibilidad Vegetativa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* en la Provincia de Almería. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 32(4), 535-544.
- Bosland, P. W. (1988). *Fusarium Oxysporum*, a Pathogen of Many Plant Species. In G. S. Sidhu (Ed.), *Advances in Plant Pathology* (Vol. 6, pp. 281-289): Academic Press.
- Cerkauskas, R. F., Brown, J., & Ferguson, G. (2001). First Report of Fusarium Stem and Root Rot of Greenhouse Cucumber Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in Ontario. *Plant Disease*, 85(9), 1028-1028. doi:10.1094/PDIS.2001.85.9.1028A
- Cohen, R., Orgil, G., Burger, Y., Saar, U., Elkabetz, M., Tadmor, Y., Edelstein, M., Belausov, E., Maymon, M., & Freeman, S. (2015). Differences in the responses of melon accessions to fusarium root and stem rot and their colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Plant pathology*, 64(3), 655-663.
- De Cara-García M., L. C., Fernández-Plaza M., Muela-Jordán L., Boix-Ruiz A., Steinberg C. (2017). *Root colonization of a host (Cucumis sativus) and a non-host (Solanum lycopersicum) species by a DsRed-fluorescent strain of the specific pathogen Fusarium oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum.*
- Elkabetz, M., Paris, H. S., Burger, Y., Hanan, A., & Cohen, R. (2016). Two genes for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in melon (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae). *Scientia Horticulturae*, 201, 57-60. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.029>
- Garrett, S. D. (1970). Pathogenic root-infecting fungi. *Pathogenic root-infecting fungi*.
- Messiaen, C. M., Blancard, D., Borrego Pitarch, V., Lafon, R., Borrego, M., Vicente, J., ... & Rouxel, F. (1994). (1995). Enfermedades de las Hortalizas (No. 632:635.1/. 8.). Mundi-Prensa,. 227-228.
- Muela Jordán L., D. C.-G. M. (2015). Estudio mediante microscopía de fluorescencia de la colonización radicular en plantas hortícolas por aislados transformados del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. . *Trabajo de Fin de Máster. Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria. Universidad de Almería*.
- Nahalkova, J., & Fatehi, J. (2003). Red fluorescent protein (*DsRed2*) as a novel reporter in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters*, 225(2), 305-309. doi:10.1016/S0378-1097(03)00534-2
- Nahalkova, J., Fatehi, J., Olivain, C., & Alabouvette, C. (2008). Tomato root colonization by fluorescent-tagged pathogenic and protective strains of *Fusarium oxysporum* in hydroponic culture differs from root colonization in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 286(2), 152-157. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01241.x
- Nelson, P. E., Tammen, J., & Baker, R. (1960). Control of vascular wilt diseases of carnation by culture-indexing. *Phytopathology*, 50, 356-360.
- Punja, Z., Parker, M., Rose, S., Louie, D., & Ng, K. (1998). *Occurrence of Fusarium crown and root rot, a new disease on greenhouse cucumbers in British Columbia, and methods for disease control*. Paper presented at the Cucurbitaceae.
- R.A.I.F., R. D. A. E. I. F., CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, P. Y. M. A., & Almería, D. P. d. (2012). Balance anual campaña del pepino en Almería.
- Scheffknecht, S., Mammeler, R., Steinkellner, S., & Vierheilig, H. (2006). Root exudates of mycorrhizal tomato plants exhibit a different effect on microconidia germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* than root exudates from non-mycorrhizal tomato plants. *Mycorrhiza*, 16(5), 365-370.

- Vakalounakis, D., Wang, Z., Fragkiadakis, G., Skaracis, G., & Li, D.-B. (2004). Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCG, and RAPD. *Plant Disease*, 88(6), 645-649.
- Valera, D. L., Belmonte, L., Molina, F., & López, A. (2014). Los invernaderos de Almería. Análisis de su tecnología y rentabilidad. *memorias I seminario técnico agronómico. Universidad de Almería. CAJAMAR. Almería, España.*
- Vargas, M. P., Bedriñana, M. A., de Cara García, M., Hernández, M. S., & Marquina, J. C. T. (2009). Patogénesis y especificidad parasitaria de aislados españoles de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerium* DJ Vakalounakis. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 35(2), 297-316.
- Wall, M. A., Socolich, M., & Ranganathan, R. (2000). The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog *DsRed*. *Nat Struct Biol*, 7(12), 1133-1138. doi:10.1038/81992
- Williams, H. (1996). Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* f. sp. nov. *Plant Disease*, 80(3), 313.